

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1970

N°

THESE

676

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

GUY DE MONTIS

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 1^{er} Décembre 1937 à Neuilly-sur-Seine

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

1970

RECHERCHES PHYSIOPATHOLOGIQUES
SUR LES MASTOCYTES
UTILISANT UNE NOUVELLE TECHNIQUE D'EXTRACTION.

Président : Monsieur R. LAPLANE, Professeur.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1970

N°

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

GUY DE MONTIS

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 1^{er} Décembre 1937 à Neuilly-sur-Seine

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

1970

RECHERCHES PHYSIOPATHOLOGIQUES
SUR LES MASTOCYTES
UTILISANT UNE NOUVELLE TECHNIQUE D'EXTRACTION.

Président : Monsieur R. LAPLANE, Professeur.



A la mémoire de Claude MIKOL (1921-1967)

Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Paris

Authentique savant, chercheur né,
nous lui devons le sujet de ce travail
qu'il aurait du superviser et orienter.
Trop tôt disparu, qu'il y soit néanmoins
associé.

A Monsieur le Professeur R. LAPLANE
Médecin de l'Hôpital Trousseau
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

qui nous fait le grand honneur de bien
vouloir présider cette thèse.

Il sait notre attachement à son Service
auquel il a insufflé une cohérence
sans monotonie, une diversité sans
éparpillement, une discipline sans
intolérance;

en témoignage de notre profonde et
respectueuse gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551504_0040

A mon Père

Médecin tout dévoué à ses malades,
son exemple quotidien a nourri
notre vocation
et à ma Mère;

à ma femme et à mes enfants:

Arnauld

Bruno

Cyrille

Diane.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux de Paris:

EXTERNAT

Professeur J. HUGUIER

Professeur R. WOLFROMM

Docteur P. de GRACIANSKY

Professeur J. FACQUET

Professeur A. ROSSIER

Professeur B. DUPERRAT

Professeur J. BOUSSER

Professeur J. TURIAF ;

INTERNAT

Docteur Roger EVEN,

et Professeur agrégé Christian SORS

Professeur Jacques LOEPER

Professeur Jacques BOUSSER,

Professeur Georges BILSKI-PASQUIER,

et Professeur agrégé Robert ZITTOUN.

A mes Maîtres en Pédiatrie (INTERNAT)

Professeur Pierre CHASSAGNE -in memoriam-
qu'un destin funeste a prématurément
ravi aux siens, à ses élèves, à la
Médecine;

Professeur agrégé Jacques GERBEAUX
tout à la fois subtil et familier,
son enseignement de la Pneumologie
Infantile est exceptionnel;

Professeur Claude POLONOVSKI
et Professeur agrégé Géraud LASFARGUES
équipe féconde, dans le Service et
sous la bienveillante autorité de
notre Président de Thèse;

Professeur Alfred ROSSIER
et Docteur Jean-Claude JOB
auprès de qui nous terminons notre
Internat, dans la calme et studieuse
atmosphère qui fit naître notre
orientation pédiatrique.

A mes Maitres du Laboratoire de Médecine
Expérimentale de la Faculté de Médecine

Professeur F.-P. MERKLEN

qui, en nous accueillant dès le début de notre
Internat, nous a permis de nous initier aux
principes de la Physiopathologie, et aux
techniques de laboratoire,

Respectueux remerciements.

Professeur P. BERTHAUX

Professeur agrégé F. COTTENOT

Professeur agrégé J. PAUPE.

A Monsieur le Professeur Agrégé Mario RENOUX
Médecin des Hôpitaux de Paris
qui a bien voulu, lors du morcellement de la
Faculté de Médecine, nous prendre dans
son équipe à l'U.E.R. COCHIN-PORT-ROYAL
et diriger, depuis, nos travaux,
en gage de mon dévoué attachement

et à mes collègues du Laboratoire de Médecine
Expérimentale et d'Immunologie de l'U.E.R.
COCHIN-PORT-ROYAL,
en toute amitié.

AVANT-PROPOS

oooooooooooooooooooo

Le nom de Mastocyte est étymologiquement mal construit, et certains auteurs lui préfèrent le nom de Labrocyte; il est toutefois authentifié par de nombreux travaux, tant fondamentaux que cliniques, aux signatures illustres (SEZARY -41-; DEGOS -15-) et c'est à la suite de ces auteurs que nous conserverons ce nom.

oooooooooooooooooooo

INTRODUCTION

oooooooooooooooooooo

Les problèmes soulevés par l'Allergie intéressent au premier chef les cliniciens:

qu'il s'agisse des accidents spontanés d'origine alimentaire, respiratoire ou par contact, de plus en plus fréquents;

qu'il s'agisse des accidents provoqués par les produits de synthèse, et en particulier les produits pharmaceutiques, à l'origine desquels le Médecin est directement impliqué.

La gravité possible de ces accidents rend de plus en plus indispensable leur prévention systématique, l'élimination de toute arrière-pensée d'allergie avant la prescription de traitements réputés sensibilisants. Le Médecin doit pour cela disposer d'une méthode simple, rapide et peu coûteuse. Malheureusement, il se heurte

à la pluralité des Anticorps
à la difficulté de leur mise en évidence
et plus encore de leur dosage.

PLURALITE DES ANTICORPS. On distingue l'Allergie humorale, qui se manifeste peu de temps après le contact avec l'antigène et qui est transmise par le sérum, dans laquelle on s'efforce de retrouver les Anticorps; et l'Allergie tissulaire, dont les manifestations sont retardées et pour lesquelles on ne peut mettre en évidence d'Anticorps circulants. En outre, l'Allergie humorale comporte des Anticorps variés: les réagines, thermolabiles, sensibilisant la peau de sujets sains (réaction de PRAUSNITZ et KUSTNER) et dont la présence témoigne souvent d'un terrain particulier, dit "atopie"; et les Anticorps immuns, beaucoup plus proches de ceux que l'on provoque par expérimentation animale.

MISE EN EVIDENCE. Nous ne détaillerons pas les techniques allergologiques utilisées en Clinique: cuti et intra-dermo réactions, réaction de PRAUSNITZ et KUSTNER. Malgré leur intérêt, elles connaissent en effet deux types d'écueils

ces tests ne sont pas toujours réalisables, en particulier si le malade est porteur d'un exanthème généralisé, ni interprétables, s'il reçoit un traitement qui déprime ses réactions d'hypersensibilité, comme les Corticoïdes.

ces tests ne sont pas dénués de danger, et l'on sait que l'injection intra-dermique de Pénicilline à des fins de diagnostic allergologique est formellement proscrite. Comme les autres allergènes, elle peut en effet provoquer un grand choc anaphylactique, et des accidents de moindre gravité, comme la réactivation d'un processus immunologique chronique plus ou moins quiescent ou en voie d'extinction.

C'est pourquoi de nombreux auteurs ont cherché à dépister ces Anticorps allergiques par les techniques immunologiques classiques, in vitro. Force est de reconnaître que ces études sont demeurées infructueuses.

REACTIONS DE PRECIPITATION Ce sont, en expérimentation animale, les plus simples à réaliser, à reproduire, à comprendre. Elles permettent également une appréciation quantitative de la teneur en Anticorps d'un immun-sérum, par la zone d'équivalence, ou mieux par le dosage d'azote du précipité. Mais, sauf cas exceptionnels, les Anticorps allergiques humains ne sont pas précipitants.

REACTIONS DE DEVIATION DU COMPLEMENT Malgré les travaux de CAVELTI -11- et de PORTNOY et SHERMANN-35- elles ne semblent pas utilisables.

REACTIONS D'AGGLUTINATION PASSIVE.

D'une bien plus grande sensibilité, elles sont un appoint très important au diagnostic immunologique. On retiendra les hémagglutinations passives, par hématies sensibilisées, comme le fait COOMBS -12-, par hématies tannées, selon la technique de BOYDEN -8- ou après liaison bis-diazo-benzidine; les méthodes au latex de polystyrène, qui, depuis la description de SINGER et PLOTZ connaissent de nombreux développements. Comme les autres agglutinations (active ou passive sur collodion, cholestérol) elles peuvent donner lieu, par dilution, à l'établissement d'un titre, évaluant de façon semi-quantitative la teneur en Anticorps d'un sérum. Malheureusement il est impossible de connaître avec précision la nature des Anticorps dépistés de cette manière, au moins en matière d'Allergie: réagines ou Anticorps bloquants. On a en effet constaté l'élévation du titre au cours de traitements désensibilisants-16-19-

REACTIONS CELLULAIRES.

Le test de SHELLEY -42-, dégranulation de Polynucléaires Basophiles prélevés chez le malade, ou mieux, chez le lapin et passivement sensibilisés, en présence de l'antigène, est pour d'autres auteurs difficilement reproductible.

Les tests mastocytaires, objet de ce travail.

Le test de transformation lymphoblastique (HALPERN et coll.-26-), dont l'intérêt ne se dément pas, mais qui s'applique surtout aux phénomènes d'allergie tissulaire et à ses corollaires, comme le rejet de greffe; au demeurant, il n'a pas encore d'utilisation quantitative.

RADIO-IMMUNOLOGIE. -50-

Citons encore les méthodes aux protéines marquées radio-actives, de plus en plus nombreuses, susceptibles de résoudre le problème du dosage des réagines allergiques, si l'on peut disposer d'une quantité suffisante d'immunoglobulines de type Ig E, et par suite d'antisérum spécifique pour précipiter les complexes antigène marqué-réagines. Mais ces méthodes continueront d'exiger des laboratoires très spécialisés, bien équipés en personnel et en matériel.

DOSAGE DES ANTICORPS.

La méthode de HEIDELBERGER et KENDALL, très précise puisqu'elle dose l'azote total du précipité, en déduit le poids d'azote anticorps et donc le poids d'anticorps, ne s'applique qu'à des anticorps précipitants.

Les méthodes d'agglutination permettent par dilution et titrage des appréciations et des comparaisons de taux d'anticorps ; mais non leur dosage.

La radio-immunologie n'a pas encore pu appliquer à l'allergie sa sensibilité et sa précision.

Il reste les techniques cytologiques, en particulier celles qui emploient des Mastocytes. De nombreuses études fondamentales et expérimentales permettent en effet d'attribuer à ces cellules un rôle important dans les manifestations d'hypersensibilité immédiate, comme dans d'autres domaines de la Physiopathologie générale, pour lesquels il importe de disposer in vitro de cellules réactives, biologiquement intactes.

PREMIERE PARTIE

LES MASTOCYTES

oooooooooooo

HISTORIQUE

oooooooooooo

Bien que les premières descriptions remontent, semble-t-il, à VON RECKLINGHAUSEN en 1863, c'est à Paul EHRLICH que l'on doit la découverte des Mastocytes, grosses cellules de vingt à trente microns, au cytoplasme bourré de granulations métachromatiques. Les histologistes s'efforcèrent alors, par souci uniciste, de regrouper sous un même vocable les Mastocytes et d'autres cellules non métachromatiques. C'est l'époque de UNNA, WALDEYER, RANVIER, et l'on confond alors plus ou moins les Basophiles, Histiocytes et Monocytes.

Puis les Mastocytes acquirent un intérêt clinique quand UNNA, en 1894, constate que les éléments cutanés de l'Urticaire pigmentaire sont constitués de Mastocytes. Dès lors, ce sont surtout les Dermatologues qui vont s'intéresser à ces cellules. On en découvre un peu partout, on soupçonne une probable filiation entre leur abondance et le dermatographe, on ne s'explique pas les troubles vaso-moteurs constatés dans certaines circonstances (bains chauds) chez les sujets atteints de mastocytose. Ces phénomènes ne seront compris qu'à l'ère biochimique des Mastocytes qui débute en 1953 avec RILEY et WEST (37). Si JORPES et ses collaborateurs ont en effet découvert en 1937 l'Héparine, sa métachromasie, la proportionnalité de son abondance tissulaire avec la concentration en Mastocytes; la nature du contenu mastocytaire reste méconnue jusqu'à RILEY et WEST qui mettent en évidence sa richesse en Histamine. Les découvertes se succèdent alors:

1954: ASBOE-HANSEN montre les corrélations avec la teneur tissulaire en acide hyaluronique. La même année, COTTENOT, en soumettant des lapins à un régime thiolprive montre que les Mastocytes sont des utilisateurs privilégiés du Soufre.

1955: BENDITT y met en évidence la Sérotonine, et ARVY (5) fait une première revue des enzymes qui s'y trouvent. SCHAUER y reviendra en 1964. Depuis la biochimie des Mastocytes ne semble guère avoir progressé; mais leur utilisation en Recherche Physiopathologique s'est beaucoup développée.

ROLE DE QUELQUES MEDiateURS CHIMIQUES

Un certain nombre de substances chimiques simples, de faible poids moléculaire jouent un rôle important dans les manifestations de l'Anaphylaxie et de l'Hypersensibilité immédiate, ainsi que sur la microcirculation. Leurs autres actions seront volontairement négligées dans cette étude.

L' HISTAMINE est la plus connue. C'est en effet dès 1910 que DALE et LAIDLAW ont constaté les symptômes du choc histaminique, et leur étroite analogie avec ceux du choc anaphylactique. Son action pharmacodynamique locale a été ensuite précisée par LEWIS (1927):

- dilatation circonscrite des capillaires
- augmentation de leur perméabilité, responsable de l'oédème
- et plus à distance, dilatation artériolaire.

L'ensemble, qui réalise une triade, témoigne de sa vaso-activité. On sait aujourd'hui que ces phénomènes sont liés à un relâchement du tonus méta-artériolaire et des sphincters précapillaires, et à une constriction veinulaire; ainsi qu'à des lésions directes de la paroi capillaire avec gonflement de la membrane basale et disjonction des cellules endothéliales entre elles.

(MAJNO et PALADE -28-). Outre son action sur le capillaire, l'Histamine est un puissant constricteur des fibres musculaires lisses, chez le cobaye en particulier, à qui les aérosols d'Histamine provoquent un bronchospasme qui peut être rapidement mortel. L'Histamine est habituellement stockée dans l'organisme sous forme inactive, et sitôt libérée, elle est rapidement soit conjuguée à un facteur plasmatique, soit dégradée en imidazolacétaldéhyde par une histaminase. La preuve du rôle de l'Histamine dans l'anaphylaxie a été apportée en 1932 par GEBAUER-FUELNEGG et ses collaborateurs sur le foie de chien et par BARTOSCH et ses collaborateurs sur le poumon de cobaye. Elle a depuis été confirmée par de nombreux autres travaux.

LA SEROTONINE a des actions complexes et encore mal connues .
 La découverte de son rôle immunologique est d'ailleurs beaucoup plus récente, puisque c'est en 1955 qu'HUMPHREY et JAKES l'ont pour la première fois reconnue in vitro lors de réactions antigène-Anticorps utilisant des Plaquettes sanguines de lapin. Son activité immunologique chez l'homme, admise par de nombreux auteurs est réfutée par d'autres (BROCKLEHURST -10-). A l'inverse, son rôle sur la microcirculation est bien connu, surtout par les études de ROWLEY (38) et de DIANA: injectée au chien par voie veineuse, elle entraîne une réponse tensionnelle triphasique: hypotension fugace réflexe

hypertension secondaire par vaso-constriction quasi-généralisée
 enfin hypotension prolongée qui serait due au remplissage du lit capillaire par constriction veinulaire. La Sérotonine a en effet cette action en commun avec l'Histamine, et comme elle d'ailleurs elle lèse la paroi capillaire par disjonction des cellules endothéliales et fait contracter les fibres musculaires lisses.

LES KININES ont des actions voisines de celles de l'Histamine et de la Sérotonine: douleur

contraction musculaire lisse intense
 vaso-dilatation capillaire
 augmentation de la perméabilité capillaire,

ces deux dernières actions dues en fait à la contraction veinulaire, qui est potentialisée par la Sérotonine, et beaucoup plus prolongée. Ces Kinines, de découverte très récente sont la Bradykinine (1949), la Lysyl-bradykinine (1961) et la Méthionyl-lysyl-bradykinine (ELLIOTT, 1963). Elles proviennent toutes de polypeptides normalement inactifs, qui sont activés par la Kallikréine. Paradoxalement celle-ci est de connaissance plus ancienne puisqu'elle a été découverte par WERLE en 1937.

Le rôle des Kinines en Anaphylaxie est probable chez le chien, le cobaye, le rat et le lapin (BROCKLEHURST et coll.), mais n'est pas avéré chez l'homme. On soulignera cependant les analogies enzymatiques qui existent entre le système de dégradation des Kinines par les kininases qui libèrent le chaînon Arginine de l'Azote terminal, et le mode d'activation du Complément (LAGUNOFF-27-).

D'autres médiateurs chimiques, plus complexes paraissent jouer un rôle en Immunologie: c'est le cas de la SRS-A (slow reacting substance in anaphylaxis) lipide lié à une protéine. Elle est mise en évidence par la perfusion de poumons isolés de cobaye, lapin ou homme sensibilisé, perfusés par une solution de l'antigène correspondant, et provoque une lente contraction de l'iléon de cobaye. (BROCKLEHURST)

Contrairement à l'Allergie immédiate et à l'Anaphylaxie, l'Hypersensibilité retardée a été longtemps réputée dépourvue de médiateurs chimiques, bien que l'augmentation de l'histidine-décarboxylase in situ ait incité certains auteurs à faire jouer un rôle à l'Histamine localement libérée. Des travaux récents ont pourtant signalé l'existence de substances de nature chimique encore indéterminée:

le M.I.F. (migration inhibitor factor)

le L.N.P.F. (lymph node permeating factor)

et plus généralement ce que l'on tend à appeler "Lymphokines".

(DUMONDE et coll., 1969)

MASTOCYTES ET MEDiateurs CHIMIQUES.

Après la mise en évidence de l'Héparine dans les Mastocytes (JORPES, HOLMGREN et WILANDER), WILANDER s'est intéressé à l'hypocoagulabilité des chiens soumis à un choc peptonique; ROCHA E SILVA a constaté la libération conjointe d'Héparine et d'Histamine du foie des chiens, et finalement c'est RILEY et ses collaborateurs qui ont prouvé la constante proportionnalité entre la teneur en Histamine et la richesse en Mastocytes de divers tissus, ainsi que l'étroit rapport qui unit la dégranulation des Mastocytes et la teneur en Histamine. Ces constatations, faites sur des tissus normaux, ont été corroborées par l'étude de tissus pathologiques: mastocytomes du chien et Urticaire pigmentaire chez l'homme (BLOOM). On a même calculé que chaque Mastocyte contient en moyenne vingt picogrammes d'Histamine-base (GRAHAM: 7 pg. chez le chien

32 pg. chez le boeuf

BOREUS: 21 à 34 pg. chez le cobaye

HUMPHREY: 10 à 20 pg. chez le rat).

La localisation de la Sérotonine sur les Mastocytes (BENDITT, 1955) a suivi de peu, ainsi que la mise en évidence à leur niveau d'une 5-hydroxytryptophane-décarboxylase, l'une et l'autre chez le rat et la souris.

En revanche, elles semblent manquer dans d'autres espèces et en particulier chez l'homme (PARRATT et WEST)

La Slow Reacting Substance paraît également se libérer des Mastocytes.

(SILVERSTEIN),

De très nombreuses enzymes ont été aussi trouvées dans les Mastocytes:
dans les granules

Trypsine
Chymotrypsine
Leucine-aminopeptidase
ATP-ase
Glycuronidase
Phosphatases acide et alcaline

dans le cytoplasme

Histidine-décarboxylase
5-HT-décarboxylase
DOPA-décarboxylase
ATP-sulfurylase
APS-kininase
Sulfotransférase

dans les mitochondries

Succino-déshydrogénase
Amine-oxydase
Fumarase

dans la membrane enfin

Phospholipase A (lécithinase A)
Alpha-chymotrypsine
et une enzyme analogue à la
Trypsine, du moins chez l'homme

et le chien (GLENNER et COHEN). C'est l'activation de la Phospholipase, normalement inactive, qui serait responsable de la dégranulation mastocytaire (HOGBERG et UVNAS).

EXPERIMENTATIONS SUR TISSUS ET ANIMAUX VIVANTS.

Avant même que soit connue l'étroite relation qui unit l'Histamine aux Mastocytes avait été constatée la dégranulation de ceux ci lors des réactions anaphylactiques (WILANDER). Leur étude a connu ensuite un important essor:

- chez le cobaye sensibilisé activement et passivement (MOTA et VUGMAN)
- chez la souris (MOTA, BRIGGS), mais seulement après sensibilisation active, en particulier avec *Trichinella Spiralis* (9)
- chez le rat sensibilisé activement (KELLER, MOTA, UVNAS).

Toutes ces expériences sont concordantes: l'agression immunologique d'animaux activement sensibilisés provoque une dégranulation mastocytaire.

En même temps, la recherche et l'étude d'organes de choc de l'Anaphylaxie a provoqué des expériences sur tissus isolés. C'est ainsi que l'on a employé du poumon de Cobaye, avec pour essentiel intérêt de montrer que la libération d'Histamine lors d'une agression anaphylactique était partiellement inhibée par contact préalable du tissu sensibilisé avec l'antigène, à la température du laboratoire, pendant plus de quinze minutes (MONGAR et SCHILD); que la présence d'ions Calcium était nécessaire; que le pH devait se maintenir dans une zone étroite.

Dans des conditions à peu près identiques ont été étudiés divers inhibiteurs de la libération d'Histamine à partir des Mastocytes: Ninhydrine, Di-isopropyl-fluorophosphate, acides gras insaturés. Ces études étaient essentiellement faites sur la quantité d'Histamine libérée, retrouvée dans le surnageant, mais aussi sur l'aspect histologique dégranulé des cellules(MOTA).

Chez le rat sensibilisé par vaccin anti-coquelucheux, l'étude des Mastocytes de la peau a confirmé la nécessité de la présence d'ions Calcium, la dégranulation étant inhibée par l'EDTA.

.....

PROTOCOLES D'EXTRACTION

De très nombreuses techniques ont été proposées, en ce qui concerne les Mastocytes de rat; mais toutes sacrifient les animaux par saignée, introduisent dans l'abdomen un liquide physiologique, et massent la cavité abdominale pour extraire les Mastocytes du mésentère. Parmi toutes les techniques on retiendra celles de :

PADAWER et GORDON (33), introduisant du soluté isotonique de chlorure de sodium dans la cavité abdominale;

UVNAS et THON (46), qui préfèrent la Solution de HANK et massent l'abdomen pendant quatre-vingt dix secondes seulement;

MOTA et DIAS DA SILVA (30), utilisant un soluté de chlorure de sodium à 8,5 pour mille, et massant l'abdomen une minute;

SCHWARTZ et ses collaborateurs (40, 47) ont pour leur part utilisé le Milieu 199, et massent trois minutes.

D'autres, après un massage abdominal de quatre-vingt dix secondes introduisent le même liquide dans la cavité pleurale pour un nouveau massage de quatre vingt dix secondes.

La plupart de ces auteurs enrichissent ensuite leur suspension cellulaire en Mastocytes par une centrifugation en double couche avec un gradient de densité:

- solution sucrée pour PADAWER et GORDON;
- FICOLL[®] (polysaccharide hydrosoluble de haut poids moléculaire) pour UVNAS et THON;
- Albumine en solution concentrée pour KELLER et BEEGER, ARCHER, MOTA et DIAS DA SILVA.

Toutes ces méthodes, encore reprises par JOHNSON et MORAN (23) sont très élégantes, et permettent d'obtenir une grande concentration de Mastocytes, en éliminant la plupart des autres éléments cellulaires. Ceci est indispensable

dans la mesure où le résultat des expériences comportera le dosage de l'Histamine libérée. Malheureusement, les Mastocytes perdent spontanément une partie de celle-ci en deux heures environ, sauf dans la technique de BAECKELAND qui ajoute du Dextran ou de la Polyvinylpyrrolidone de façon à obtenir une pression osmotique identique à celle du plasma, et qui ne semble pas avoir souffert des effets histamino-libérateurs que peuvent exercer ces substances.

VARDINON, LEVANON et SCHWARTZ (47), qui lisent la cytologie n'ont pas recours à la centrifugation en double couche; pas plus que VITRY et OHRESSER (48) dont la technique est originale: ils broient le mésentère des rats dans une solution de saccharose et isolent les granulations.

Notons enfin que KELLER a également isolé des Mastocytes de souris et de hamsters.

EXPERIMENTATIONS IN VITRO

Presque tous les travaux comportent simultanément le dosage de l'Histamine libérée et l'établissement d'un pourcentage de cellules dégranulées, après coloration au Bleu de Toluidine. L'action spécifique des antigènes sur les Mastocytes de rats sensibilisés est confrontée avec l'action d'un libérateur d'Histamine, habituellement le 48/80. SCHWARTZ et VARDINON, quant à eux, colorent les étalements au Rouge Neutre. Ils ont surtout le grand mérite d'avoir, les premiers, envisagé une réaction d'inhibition de la dégranulation mastocytaire (1965).

La multitude des publications consacrées à ce sujet interdit d'entrer dans les détails, mais il faut citer les travaux récents de BAECKELAND (7) qui s'éloignent de l'Immunologie, pour entrer dans le domaine de la Recherche fondamentale en Physiopathologie: il constate la dégranulation de Mastocytes de rat lors de la coagulation du Plasma humain frais où il les met en suspension, dégranulation qui ne se produit plus avec un plasma vieilli.

CRITIQUE D'ENSEMBLE DE CES METHODES.

Toutes les techniques décrites jusqu'ici sont des techniques de Recherche qui ne semblent pas utilisables en pratique courante de Laboratoire de clinique:

Extraction : ces méthodes employent en effet un grand nombre d'animaux: JOHNSON et MORAN (23) ont besoin de trois ou quatre rats par expérience en 1966, de quatre à huit rats en 1969 (22); UVNAS et THON tuent six rats par expérience. Ce n'est évidemment pas le moindre défaut, dans l'optique d'un emploi généralisé, que de sacrifier tant d'animaux, qu'il a fallu au préalable sensibiliser. En outre ces animaux sont saignés -sauf par VARDINON- et il est probable que, malgré l'anesthésie, le collapsus circulatoire induit déjà des modifications des Mastocytes, ou au moins modifie leur réactivité, compte tenu de ce que l'on sait de leur action sur la microcirculation. Il est curieux à cet égard de constater que les seuls travaux sur les modifications des Mastocytes au cours de l'hémorragie (MESSERSCHMITT) se sont limités à découvrir une augmentation de leur population dans la moëlle osseuse de l'homme ayant une anémie hypochrome par hémorragies répétées.

Expérimentation : dans la plupart des techniques décrites, le résultat est apprécié de deux façons:

l'une, considérée comme semi-quantitative, l'observation au microscope à contraste de phase, et après coloration avec des colorants vitaux (Bleu Trypan, Nigrosine) de l'aspect morphologique des cellules;

l'autre, théoriquement plus précise, quantitative, basée sur le dosage (43) de l'Histamine libérée, ce qui exige un fluoromètre et un personnel habitué à la technique délicate qu'est l'extraction d'Histamine des milieux biologiques.

VARDINON, LEVANON et SCHWARTZ lisent directement sur lame l'aspect cytologique de quarante cellules, après coloration au Rouge Neutre. Ce petit nombre de Mastocytes ne permet guère une exploitation statistiquement sûre des résultats.

Enfin deux problèmes concernant la connaissance fondamentale des Mastocytes restent en suspens: leur origine et la cause exacte de leur dégénération.

ORIGINE DES MASTOCYTES

Elle a fait l'objet d'un certain nombre de travaux, et de beaucoup d'hypothèses. D'une part, des contradictions apparaissent selon les observateurs sur l'existence ou non de mastocytes en mitose, (constatée par MICHELS, 1938; BLOOM, 1960; ALLEN, 1961 ; réfutée par DRENNAM, 1951 et BURTON, 1963.)

D'autre part leur multiplication pourrait se faire au stade de cellules-souche, non granuleuses. C'est l'avis d'ASBOE HANSEN (1965) après étude à la thymidine tritiée.

Mais surtout, les mastocytes pourraient provenir de la différenciation d'autres cellules jeunes :

- endothéliales (QUENSEL ; 1933)
- cellules souches lymphoïdes (HILL et PRASLICKA, 1958).
- cellules mésenchymateuses indifférenciées.

Signalons également la constatation de GINSBURG et SACHS (1963), très intéressante, mais qui ne semble pas avoir été renouvelée : ces auteurs voient apparaître une culture "pure" de mastocytes dans une culture de lymphocytes thymiques de souris. L'intérêt essentiel de cette observation est de mettre en évidence le rôle du thymus, déjà admis par CSABA (1961), et qui cadre bien avec le rôle immunologique des mastocytes.

En 1967 SAGHER et EVEN PAZ ont fait le point des théories: les mastocytes proviendraient :

- de la différenciation de plasmocytes, histiocytes et fibroblastes ;
- de cellules réticulaires mésenchymateuses selon la généalogie suivante : cellule réticulaire → histioblaste → histioblaste à granulations métachromatiques → promastocyte, mastocyte.
- de la division de cellules souches préexistantes (mastoblastes ?)

-de la migration de granulocytes . basophiles .

La parenté des mastocytes avec d'autres cellules est en effet de constatation courante :

-cellules juxta-glomérulaires du rein (CORBASCIO-1960)

-cellules chromaffines de la peau et de l'estomac .

-granulocytes éosinophiles, dont la concentration dans les tissus normaux, inflammatoires et dans les foyers nécrotiques est proportionnelle au nombre des mastocytes (PRAKKEN et WOERDEMAN ; WEST; FERNEX .)

-basophiles surtout :

. dont les granulations sont aussi métachromatiques

. qui contiennent très probablement de l'héparine et de l'histamine

. la concentration des mastocytes tissulaires est en règle inversement proportionnelle à celle des basophiles circulants (ces derniers nombreux chez le lapin et les oiseaux, à l'inverse de l'homme, du cobaye, du chien, du rat et de la souris)

. ils sont également susceptibles de se dégranuler sous de mêmes agressions .

Ces analogies n'excluent toutefois pas des différences fondamentales :

-d'aspect morphologique (taille, aspect du noyau);

-d'origine, myéloïde pour les basophiles, conjonctive pour les mastocytes ;

-de cytochimie : les basophiles donnent une réaction de peroxydases positive .

DEGRANULATION.

Elle a été étudiée essentiellement sur les mastocytes isolés du rat, et, plus récemment du hamster (KELLER).

C'est apparemment par activation d'une phospholipase A (HOGBERG et UVNAS) qui hydrolyse les phospholipides de membrane qu'a lieu la cytolyse mastocytaire.

Cette action est inhibée par l'anoxie, et la présence d'inhibiteurs de la phosphorylation oxydative, sauf après incubation avec du glucose (DIAMANT et UVNAS), ce qui rend compte de la consommation d'énergie nécessaire à la libération d'histamine.

UVNAS et THON (1961) ont testé 35 autres enzymes, sans leur trouver d'action dégranulante ; pourtant RILEY attribuait un rôle important à la phospholipase C, ce que corrobore HABERMANN avec la toxine de *Clostridium perfringens*, contrairement à FREDHOLM.

Finalement, selon KELLER (1962), la phospholipase C ne serait active qu'à forte concentration, à des doses largement supraphysiologiques.

De même, l' α chymotrypsine n'agit qu'à une forte concentration, d'ailleurs l'estérase de type chymotrypsine présente dans les mastocytes de rat diffère sensiblement de l' α chymotrypsine bovine.

En tout état de cause, si d'autres enzymes peuvent expérimentalement provoquer la dégranulation de mastocytes, le rôle essentiel semble bien joué par la phospholipase A.

Mais ces constatations ne résolvent pas pour autant le problème de l'activation enzymatique, ni celui de la libération des granules :

- par lyse de la membrane cellulaire ;
- par expulsion hors d'une cellule restée vivante ;
- par clasmotocytose.

En effet l'observation vitale sur des mastocytes isolés ne renseigne pas sur leur activité dynamique in vivo.

Enfin il reste à connaître les délais de dégranulation des mastocytes en présence d'un stimulus : diverses études sont concordantes : la libération d'histamine est complète en moins d'une minute.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS oooooooooooooooooooo

Trois soucis ont guidé nos travaux :

- la nécessité d'obtenir des mastocytes vivants
- dont l'interprétation serait objective, donc chiffrée, ce qui imposait un mode original d'exploitation de la suspension cellulaire
- et leur utilisation à un test de dépistage, voire de dosage des anticorps circulants.

La technique décrite ici, résultat actuel de nombreux tâtonnements et d'un certain nombre d'échecs, peut être considérée comme sûre et reproductible.

Notre protocole a pour but d'économiser les animaux qui sont en principe sensibilisés. Ils ne seront donc pas sacrifiés. Ce sont des rats albinos pesant environ 200 grammes.

1)-EXTRACTION DES MASTOCYTES.

1-Après anesthésie à l'éther, injection aseptique, dans la cavité péritonéale, de quinze millilitres de milieu 199 (34). Massage de l'abdomen pendant quatre minutes. Celui-ci doit être assez appuyé, malaxant en profondeur les viscères abdominaux, mais non brutal.

Toute la suite du protocole se fait en matériel stérile siliconé (produit 240 Rhodorsil Rhône-Poulenc).

Note technique : Le milieu 199, habituellement employé pour les cultures de cellules, est une solution tamponnée complexe, qui associe des Vitamines, des acides aminés (une trentaine), des sucres, des sels simples (NaCl , KCl , CaCl_2 , MgSO_4 , NaPO_4H_2 , NaCO_3H , etc), mais pas de grosses molécules protéiques.

2-Le recueil du liquide péritonéal se fait par laparotomie : incision cutanée de 3 centimètres après asepsie locale ; incision de la ligne blanche ; le péritoine n'est ouvert que sur une longueur suffisante pour le passage d'une pipette non traumatisante (à bords rodés). Ce liquide, pipetté, est mis dans des tubes à hémolyse contenant cinq gouttes d'héparine. On recueille ainsi dix à douze millilitres de liquide péritonéal. Fermeture de la laparotomie en 2 plans : musculo-péritonéal et cutané, au fil non résorbable.

Si le liquide recueilli est hémorragique, ce qui gênerait son exploitation, on peut se débarrasser des hématies par une centrifugation très lente : cinq minutes à moins de 200 tours/minute ; le culot comportera quelques cellules nucléées, et des mastocytes ; mais presque toutes les hématies s'y trouveront. Recueil du surnageant.

3-Contrôle entre lame et lamelle de l'extraction des mastocytes : ils sont très facilement identifiables sans coloration par leur volume et l'abondance de leurs granulations cytoplasmiques. En même temps on contrôle leur caractère non dégranulé. Toutefois il est préférable de faire ce contrôle à la cellule de Malassez, sur le liquide péritonéal non dilué, ce qui permet une estimation du nombre des mastocytes extraits : de 800.000 à 2.000.000 par millilitre. Une fois sur 32 expériences, il n'y avait aucun mastocyte.

2)-EXPERIMENTATION.

La suspension de mastocytes est alors répartie dans des tubes à hémolyse stériles, et soumise aux explorations. A l'issue, les tubes sont centrifugés à environ 200 g, soit 900 à 1.000 tours/minute (centrifugeuse M.S.E.) pendant cinq minutes. Le surnageant est jeté, le culot étalé sur des lames soigneusement lavées et dégraissées. Fixation à l'alcool éthylique à 90° pendant trois minutes.

Après fixation, la lame est lavée à l'eau distillée, et colorée par le Bleu de Toluidine à 1%, en solution hydro-alcoolique, pendant sept minutes. Rinçage à l'eau distillée et élimination de l'excédent de Bleu par un rapide passage à l'alcool absolu.

3)-APPRECIATION DU DEGRE DE DEGRANULATION.

Les lames ainsi obtenues peuvent tout à loisir être examinées, photographiées et conservées, constituant un document objectif. Elles comportent une population cellulaire variée : quelques hématies, des polynucléaires, des lymphocytes, des cellules endo-épithéliales en placards, parmi lesquels les mastocytes se distinguent aisément sur le double critère des granulations cytoplasmiques et de la métachromasie. Ils sont habituellement très nombreux, plusieurs centaines par lame.

La lecture prolongée des étalements montre qu'il n'est pas indispensable d'étudier toute la lame pour obtenir une interprétation statistique de l'aspect cytologique des mastocytes; on peut, nous semble-t-il, ne pas aller au-delà de deux à trois cents.

Très souvent, la quasi-totalité des cellules est intacte : les granulations sont très denses et indissociables ; ou au contraire dégranulée : cellules éclatées ayant libéré leurs granulations sur 30 microns et plus. En pareil cas, l'établissement de pourcentages, comme le font d'autres auteurs, est simple. Mais parfois les mastocytes ont un aspect intermédiaire, les granulations sont bien dissociables au sein d'une cellule apparemment intacte. Ou bien elles sont disséminées autour d'une cellule dont le pourtour reste net, parfois encore le cytoplasme est vacuolisé. Ceci nous a amené à établir un score comme on le fait pour l'étude cytochimique en Hématologie.

N. FLAVIAN (17) a déjà travaillé de cette façon sur les mésentères de rats étudiés histologiquement : les notes vont croissant de 1 à 3 selon d'importance de la dégranulation . Pour notre part, nous avons choisi des notes croissantes avec la densité des granulations (comme pour les déterminations des phosphatases alcalines leucocytaires), et ainsi on attribue :

-3 aux mastocytes intacts, très denses, dont le noyau n'apparaît que sous la forme d'une zone moins colorée au sein de granulations non dissociables ;

-2, aux mastocytes dont la zone nucléaire est optiquement vide, les granulations bien dissociables ;

-1, quand le cytoplasme est vacuolisé, ou que des granulations sont extérieures à la cellule ;

-0, quand toute limite cellulaire a disparu.

On compte environ deux cents mastocytes, en les classant en fonction de la note que leur aspect cytologique leur fait attribuer. A l'issue, la note globale est la somme des notes de chaque cellule examinée. Cette note doit être rapporté au nombre total de cellules notées : c'est le score. Ainsi pour :

n mastocytes, on note 3

m mastocytes, on note 2

p mastocytes, on note 1

q mastocytes, on note 0

représentant au total N cellules, il est clair que :

$$N = n + m + p + q$$

et que la note globale est :

$$3n + 2m + p$$

et que le score est :

$$\frac{3n + 2m + p}{N}$$

Nos essais montrent qu'en l'absence de toute agression dégranulante le score est constamment supérieur à 2. Dans l'étude d'une réaction nous avons donc admis que les scores égaux ou supérieurs à 2 correspondaient à des mastocytes statistiquement normaux, non dégranulés ; et que les scores inférieurs à 1 correspondaient à des mastocytes dégranulés. Signalons toutefois que le compte cellulaire et la notation sont alors plus difficiles, les étalements comportant beaucoup moins de mastocytes identifiables (un bon nombre doivent être totalement lysés.)

4)-CONDITIONS A RESPECTER.

1°-Lors de l'extraction, ne pas introduire un milieu hépariné dans la cavité péritonéale des rats : nous avons constaté des accidents hémorragiques : quelquefois immédiats, et le liquide recueilli était alors très sanglant ; mais aussi retardés, l'animal mourant dans les suites opératoires avec un hémopéritoine .

2°-Lors de l'expérimentation, ne pas employer l'alcool absolu, ou le mélange éthanol-formol conseillé par S ELYE pour la fixation : ils déshydratent les cellules et en rendent la lecture malaisée.

3°-Ne pas attendre le séchage de l'étalement sur la lame, avant fixation : le milieu 199 laisserait alors des cristaux qui encombrant la lame, en gênent la lecture, d'autant plus qu'ils sont partiellement métachromatiques.

ETUDE DE LA REACTIVITE DES MASTOCYTES ISOLÉS

oooooooooooooooooooo

1)- ORIENTATION GENERALE.

Cette technique n'ayant pas bénéficié de travaux antérieurs dont les résultats auraient pu être admis ou simplement rapidement contrôlés, il nous a paru indispensable de reprendre en détail l'étude de diverses agressions auxquelles peuvent être soumis les Mastocytes. Nous distinguerons:

- les agents physiques: froid, chaleur, hypotonie et hypertonie;
les variations de pH n'ont en revanche pas été étudiées, car le Milieu 199 est tamponné, et normalement de couleur rose. Cette couleur se modifie lors des variations de pH, allant du jaune franc (acide) au rouge (basique).
- les agents chimiques, parmi lesquels ont été retenus les libérateurs d'Histamine que sont le 48/80 (Laboratoires BURROUGHS WELLCOME) et la Polymyxine B (Laboratoires PFIZER) ainsi que des substances que nous voulions dans un second temps utiliser comme antigènes: Ovalbumine, Pénicilline G et extrait thyroïdien, dont il fallait vérifier l'absence d'action dégranulante non spécifique.
- les agressions immunologiques spécifiques, phase essentielle de notre travail: les rats sont sensibilisés par injection dans les coussinets plantaires d'une substance antigénique additionnée d'un égal volume d'Adjuvant de FREUND (Laboratoire DIFCO), et soigneusement émulsionnés pendant cinq minutes à l'agitateur électro-magnétique. Une fois acquise la sensibilisation, c'est à dire dès la deuxième semaine après l'injection, les Mastocytes sont extraits et mis en présence de l'antigène spécifique, à concentration croissante, toujours sous un même volume. Le but de la méthode est de mettre en évidence un seuil de dégranulation par cette action directe

et de rechercher ensuite d'éventuelles modifications de ce seuil après action sur la solution antigénique d'un immun-sérum, ou d'un sérum humain sensibilisé. Le relèvement du seuil indiquerait alors que le sérum utilisé a fixé une partie des antigènes, conférant à la réaction une valeur quantitative le relèvement du seuil exprimant l'activité anticorps du volume de sérum employé.

-les agressions immunologiques après transfert passif de la sensibilisation, c'est à dire par fixation sur les Mastocytes d'Anticorps cytophiles.

- en revanche, il n'a pas été fait d'étude sur l'Hypersensibilité retardée.

LAME	ETUDE	n	m	p	q	N	SCORE
22	24 h à 4°	75	92	49	29	245	458/245
3	48 h à 4°	11	9	11	35	66	62/66
25	10 mn à 56°	1	15	82	144	242	115/242
20	témoin	172	14	13	11	210	557/210
7	H2O 50%	32	13	10	12	67	132/67
8	H2O 75%	3	4	8	23	38	25/38
9	15p 1000 50%	101	47	51	16	215	448/215
10	20p 1000 50%	9	10	8	10	37	55/37
27	0,25 48/80	157	101	30	12	300	703/300
12	1mcg 48/80	7	13	22	37	79	69/79
30	témoin	235	49	9	3	296	812/296
28	Polymyxine 1000 U l	141	38	16	9	204	515/204

ETUDE DE LA REACTIVITE MASTOCYTAIRE

2) RESULTATS.

ACTION DEGRANULANTE DES AGENTS PHYSIQUES

Le Froid: La suspension de Mastocytes a été placée au réfrigérateur, en tubes siliconés stériles et bouchés, à +4° C, pendant 24 et 48 heures.

Le score est à la limite inférieure de la normale après 24 heures (458/245); la dégranulation est patente après 48 heures. Il n'y a alors presque plus de Mastocytes identifiables (score 62/66) (voir Tableau page 36).

La Chaleur: Les tubes de suspension mastocytaire ont été placés au bain-marie à 45° pendant vingt minutes, à 50° pendant vingt minutes, à 56° pendant dix et trente minutes. Cette température (56°C) est en effet un palier important en Immunologie: inactivation du Complément et des Réagines.

A 50°, le résultat est ininterprétable: score entre 1 et 2; après dix minutes à 56°, les Mastocytes sont dégranulés (115/242), résultat tout à fait concordant avec les manifestations cliniques vaso-motrices observées lors des bains chauds chez les sujets porteurs d'une Mastocytose cutanée.

L'Hypotonie: Le Milieu 199 a été dilué à l'eau distillée pour obtenir une concentration finale deux-tiers, un demi et un quart, dans laquelle les Mastocytes ont séjourné trente minutes.

Le score est à la limite inférieure de la normale pour une dilution au demi: 132/67; il témoigne d'une dégranulation complète pour la dilution au quart: 25/38 (voir Tableau).

L'Hypertonie: Elle a été explorée en laissant les Mastocytes en suspension quinze minutes dans un Milieu 199 étendu d'un égal volume de soluté chloruré-sodique à quinze grammes par litre d'une part, à vingt grammes par litre d'autre part. Pas de dégranulation avec le soluté à quinze pour mille (448/215) avec le soluté à vingt pour mille, score ininterprétable: 55/37; mais le petit nombre de cellules témoigne peut-être d'une dégranulation.

L'ensemble de ces essais, toujours faits avec des tubes témoins, permet de fixer les limites dans lesquelles pourra être recherchée une action immunologique spécifique. Ces limites sont d'ailleurs assez larges pour que l'emploi des Mastocytes ne souffre pas de perturbations non spécifiques:

- température inférieure à 50 degrés, et pouvant aller jusqu'à 4 degrés pendant moins de vingt-quatre heures;

- salinité de la solution antigénique pouvant aller de zéro à quinze pour mille, si son volume n'excède pas celui du Milieu 199

- pH proche de la neutralité, contrôlé par la coloration du milieu.

Ces résultats sont parfaitement comparables à ceux qu'indiquent divers auteurs parmi lesquels nous citerons ARCHER (3- 4), qui donne les résultats des aggrès-sions osmotiques in vitro, alors que la plupart des publications font état de l'action de l'eau distillée injectée par voie sous-cutanée, intra-veineuse ou intra-péritonéale (par exemple ASBOE-HANSEN et WEGELIUS, -6-); HILL (20) qui observe la dégranulation à la chaleur, alors que l'action des milieux hypertoniques et du froid in vitro ne semblent guère avoir fait l'objet de publications. Ces résultats donnent également à penser que les Mastocytes que nous extrayons restent, selon l'expression d'UVNAS et THON, "biologiquement actifs".

ACTION DES LIBERATEURS D'HISTAMINE

Le 48/80: Une solution de 48/80 à dix microgrammes par millilitre a été ajoutée à la suspension de Mastocytes, en quantité variable, mais sans que son volume dépasse celui de la suspension. La concentration la plus basse de 48/80, dans ces conditions, était de un quart de microgramme par millilitre; c'est d'ailleurs la seule qui ne soit pas dégranulante (score :703/300), ce qui correspond aux chiffres donnés par UVNAS (46) qui a dosé l'Histamine libérée en fonction de la quantité de 48/80: sa courbe part de l'axe des abscisses à 0,02 microgramme et s'élève très rapidement.

La Polymyxine B: La suspension de Mastocytes a été mise en présence de quantités variables de Polymyxine B: de 1000 à 30 000 Unités Internationales, sous un volume d'un millilitre de soluté salin. Pas de dégranulation avec 1000 U.I. (score= 515/204); mais dégranulation complète à 5000 Unités.

Nous pensons donc pouvoir affirmer que notre technique d'extraction fournit des Mastocytes ayant conservé toute leur réactivité et il est dès lors possible, en utilisant des animaux sensibilisés, de provoquer une dégranulation par agression immunologique spécifique. Encore fallait-il au préalable éliminer toute action dégranulante non spécifique des solutions antigéniques. Dans ce but des Mastocytes provenant d'animaux neufs ont été mis en présence de quantités variables d'Ovalbumine (de un millilitre à 0,1 pour mille à deux millilitres à un pour cent); de Pénicilline G, sous forme de SPECILLINE G^o (Laboratoires RHONE-POULENC) (de 10 000 à 60 000 Unités Internationales); d'extrait total de glande Thyroïde. Aucune dégranulation n'a été observée. Au demeurant, nous n'avons pas trouvé trace dans la Littérature d'action dégranulante de ces produits. Quant au solvant, qui a toujours été du soluté chloruré-sodique isotonique, il ne joue aucun rôle.

ETUDE DES AGGRESSIONS IMMUNOLOGIQUES SPECIFIQUES

PREPARATION DES ANIMAUX

Des rats Albinos, identifiés par époutage des oreilles, et de surcroît groupés dans des cages différentes selon la sensibilisation ont reçu une injection dans les quatre coussinets plantaires d'une émulsion antigénique constituée pour moitié d'Adjuvant Complet de FREUND (Laboratoire DIFCO), et pour moitié:

- d'Ovalbumine: un demi-millilitre à un pour cent. Les animaux encore vivants cinq mois plus tard ont subi une injection de rappel: trois dixièmes de millilitre à un et demi pour cent. Le choix de l'Ovalbumine s'explique par son caractère fortement antigénique en expérimentation animale.

- de Pénicilline G (SPECILLINE G°): 80 000 Unités

Internationales sous un volume d'un demi-millilitre avec rappel cinq mois plus tard de 60 000 unités et de 100 000 unités trois mois après;

d'autres rats n'ont reçu qu'une injection de 500 000 Unités Internationales.

Le choix de la Pénicilline pour des recherches sur l'Allergie humorale s'explique par la grande fréquence des sensibilisations observées en Clinique, surtout depuis l'avènement des dérivés semi-synthétiques actifs par voie orale.

- d'extrait total de glande Thyroïde, pour des recherches ultérieures sur l'auto-immunité (voir Perspectives d'Avenir).

Les Mastocytes des animaux sensibilisés, prélevés selon notre technique, ont été mis en présence de l'antigène spécifique.

OVALBUMINE:

A deux reprises, un millilitre de la suspension mastocytaire a été mis en contact pendant vingt minutes, à la température du Laboratoire, en tubes siliconés et stériles bouchés, avec une solution d'Ovalbumine, pour une concentration finale de un tiers, un demi, deux tiers et huit dixièmes pour cent. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de dégranulation.

PENICILLINE G:

De même, nous avons onze fois étudié les Mastocytes de rats sensibilisés à la Pénicilline G. Les résultats sont ici inconstants, les raisons possibles des échecs étant analysées plus loin. On remarque cependant (voir Tableau)

- que la lame 41 a été traitée par 10 000 U.I., le témoin est la lame 47;

- que les lames 247, 248, 251 ont été traitées respectivement par 10 000, 20 000 et 60 000 Unités, le témoin non traité est la lame 236;

- que les lames 134 et 135 ont été traitées respectivement par 250 000 et 300 000 U.I., le témoin non traité étant la lame 137.

On constate que les Mastocytes sont dégranulés par le contact avec l'antigène spécifique, et que le seuil se situe:

- au dessous de 10 000 unités dans le premier cas;
- entre 10 000 et 20 000 unités dans le second;
- au dessus de 250 000 Unités Internationales dans le dernier cas.

Théoriquement, il suffirait ensuite de contrôler le niveau du seuil, après action d'un sérum humain sur l'antigène, pour dépister des Anticorps circulants, et surtout pour donner une appréciation chiffrée de leur activité in vitro: le relèvement du seuil déterminant de façon quantitative cette activité.

LAME	ANTIGENE	n	m	p	q	N	SCORE
41	Péni 10 000	16	40	102	102	260	230/260
47	témoin	162	111	46	17	336	754/336
247	Péni 10 000	53	37	41	15	146	274/146
248	Péni 20 000	0	10	20	60	90	40/90
251	Péni 60 000	2	13	36	44	95	68/95
236	témoin	186	15	5	3	209	593/209
134	Péni 250000	161	29	14	2	206	555/206
135	Péni 300000	15	21	23	36	95	110/95
137	témoin	130	40	23	7	200	493/200

DEGRANULATION IMMUNOLOGIQUE SPECIFIQUE

3)-ANALYSE CRITIQUE DES CAUSES D'ERREUR.

En ce qui concerne l'Ovalbumine:

Il semble (travaux de MOTA, 1962) que les Anticorps précipitants obtenus par hyperimmunisation du rat, comme du lapin, ne sont pas fixés sur les Mastocytes et que, par conséquent, ceux-ci ne peuvent être dégranulés en présence de l'antigène correspondant. MOTA a d'ailleurs proposé la notion d'Anticorps spéciaux sensibilisant les Mastocytes ("mast cell sensitizing antibody"). L'Ovalbumine, connue pour produire des Anticorps précipitants a peut-être été hâtivement choisie.

En ce qui concerne la Pénicilline:

Deux essais ont donné des résultats satisfaisants: lames 41 et 247, 248, 251; un autre ne peut être considéré comme intéressant: lames 134 et 135; on ne peut en effet, quand la dégranulation est acquise avec 300 000 U.I. de Pénicilline G, dire si elle est immunologique ou osmotique, puisque nous employons comme solvant du soluté chloruré sodique isotonique, et que la salinité de la solution -qui n'a pas été mesurée- est certainement très élevée. En outre, le plus souvent, les essais de dégranulation ont été faits trop tard: VARDINON et collaborateurs ont montré que la sensibilisation des rats était acquise dès la première semaine. MOTA (1963) situait l'optimum de sensibilisation entre le douzième et le dix-neuvième jour, alors que les Anticorps dépistés par réactions de Précipitation et d'Hémagglutination ont une activité maximale après le trente-troisième jour. La lame 41 utilise des Mastocytes extraits le 4-07-1969 d'un rat sensibilisé le 13-06-1969; les lames 247 et suivantes, techniquées le 23-12-1969, proviennent d'un rat ayant eu un rappel d'antigène le 27-11-1969. A l'opposé, les lames 134 et 135, du 3-04-1970 ont été faites avec des Mastocytes extraits d'un rat sensibilisé le 24-01-1970, donc neuf semaines plus tôt. Nos autres échecs (soit huit essais) ont également utilisé des rats dont la sensibilisation n'était pas optimale. Nos rats sont maintenant réinjectés tous les mois.

ESSAI D'APPLICATION DIAGNOSTIQUE

oooooooooooooooooooo

1)-TEST D'INHIBITION DE LA DEGRANULATION SPECIFIQUE.

Tous nos essais ont porté sur des sérums de malades ayant présenté des réactions cutanées à l'occasion de traitements pénicillaniques, imputées à une Allergie à la Pénicilline, après dépistage d'Anticorps circulants par réaction d'Héماغglutination passive (Docteur CHARLAS, U.E.R. Necker-Enfants-Malades). Malheureusement, plusieurs essais ont été inutilisables, la dégranulation spécifique n'ayant pu être obtenue (voir supra: Analyse critique des causes d'erreur). C'est pourquoi, avant tout test diagnostique, nous cherchons maintenant le seuil de dégranulation: pour cela, nous mettons en présence trois dixièmes de millilitre de suspension mastocytaire et une, deux, trois et quatre gouttes de solution antigénique, par exemple de Pénicilline G en solution à 200 000 Unités Internationales par millilitre, ce qui correspond à une concentration finale de:

- environ 30 000 U.I. par millilitre
- 50 000 U.I. par millilitre
- environ 67 000 U.I. par millilitre
- 80 000 U.I. par millilitre.

Nous pensons en effet que pour pouvoir être utilisés les Mastocytes doivent se dégranuler pour une faible concentration d'antigène, par exemple moins de 50 000 Unités Internationales de Pénicilline G par millilitre. Le contrôle est fait aussitôt, à la Cellule de Malassez, sans coloration.

Si les Mastocytes sont effectivement dégranulés, la réaction est faite de la façon suivante :

Incubation pendant vingt minutes au bain-marie à 37°C en tubes siliconés et stériles de Sérum humain à tester, un dixième de millilitre, avec quatre dixièmes de millilitre de solution antigénique de concentration croissante. Le nombre de tubes dépend du seuil de dégranulation constaté extemporanément, et ainsi, pour la recherche d'Anticorps anti-Pénicilline on pourra employer des solutions à:

100 000 U.I. par millilitre, donnant une concentration finale de 40 000 unités par millilitre,

125 000 U.I./ml. (concentration finale 50 000 unités par ml.)

750 000 U.I./ 4 ml. (donnant 75 000 unités par millilitre)

250 000 U.I./ml. (concentration finale: 100 000 U.I./ml.)

En même temps, incubation des tubes témoins:

un dixième de millilitre de sérum physiologique avec les mêmes doses de Pénicilline, ce qui constituera l'échelle de dégranulation immunologique spécifique;

un dixième de millilitre de sérum à tester avec quatre dixièmes de millilitre de sérum physiologique, pour éliminer une activité dégranulante du sérum;

un demi millilitre (0,1+ 0,4) de sérum physiologique, qui servira de témoin des Mastocytes non traités.

Après incubation , les tubes sont sortis du bain-marie, et l'on ajoute dans chacun d'eux un dmi-millilitre de suspension de Mastocytes. Sachant que la dégranulation est pratiquement complète en une minute, les tubes peuvent alors très rapidement être centrifugés, leurs culots étalés sur lame, fixés et colorés.

NOTE: la quantité de sérum utilisée, un dixième de millilitre, pour un volume final de un millilitre permet d'éviter la coagulation protidique lors de la fixation des lames à l'alcool à 90°.

Compte tenu des difficultés que nous avons rencontrées (voir page 42) deux résultats seulement nous paraissent utilisables, encore qu'ils ne résultent pas de notre protocole actuel. Leurs particularités techniques seront mentionnées.

SERUM GA. : un demi-millilitre de solution de Pénicilline G a été mis à incuber, à la température du Laboratoire, avec un demi-millilitre de sérum humain (lame 51) et un dixième de millilitre de ce même sérum (lame 52). On y a ensuite ajouté un millilitre de suspension mastocytaire. Les témoins correspondants sont les lames 47 (non traitée) et 41 (dégranulation spécifique). On peut voir sur le tableau que le sérum de ce malade comporte assez d'Anticorps fixant la Pénicilline dans un demi millilitre pour empêcher la dégranulation spécifique, mais non dans un dixième de millilitre.

SERUM BE. : de même, un dixième de millilitre de ce sérum (lame 228), incubé avec 20 000 unités de Pénicilline, et mis ensuite en présence de deux dixièmes de millilitre de la suspension mastocytaire qui était dégranulée par la même dose de Pénicilline (248) a inhibé cette dégranulation.

LAME	SERUM	Concentr. PENI.	n	m	p	q	N	SCORE
51	0,5 G	5 000 U/ml	126	53	33	4	216	514/216
52	0,1 G	5 000 U/ml	44	41	58	63	206	272/206
47	0	0	162	111	46	17	336	754/336
41	0	6 666 U/ml	16	40	102	102	260	230/260
228	0,1 B	8 000 U/ml	136	38	35	2	211	519/211
248	0	8 000 U/ml	0	10	20	60	90	40/90

INHIBITION DE LA DEGRANULATION SPECIFIQUE

2)- ESSAI DE TRANSFERT PASSIF.

Un certain nombre d'expériences ont été réalisées, avec des Anticorps anaphylactiques de rats activement sensibilisés (immun-sérums) et des Mastocytes de rats neufs (BINAGHI et BENACERRAF, 1964; MOTA, 1964); et avec des immun-sérums de lapins, anti-gamma-globulines humaines (KELLER et SCHWARZ). Les résultats ont été inconstants. Plus récemment, PERELMUTTER a utilisé un immun-sérum humain. Nous avons nous-même procédé à des essais de fixation d'Anticorps sur des Mastocytes de rat neuf non sensibilisé, en utilisant des sérums de malades ayant présenté des réactions cutanées à la suite de traitements à la Pénicilline, et du sérum de lapin sensibilisé à l'Ovalbumine, par injections intra-veineuses, contrôlé par réaction de précipitation (ring-test). Les Anticorps anti-ovalbumine de lapin et les réagines anti-pénicilline humaines sont en effet considérés comme des Anticorps cytophiles (SORKIN -45-). Mais, soit que les conditions d'incubation des Mastocytes choisies aient été mauvaises:

- vingt minutes à la température du Laboratoire
- trente minutes au bain-marie à 37 degrés
- deux heures au réfrigérateur à +4 degrés
- vingt-quatre heures au réfrigérateur à +4 degrés;

soit que la spécificité d'espèce ait empêché la fixation des Anticorps, nous n'avons pu obtenir de transfert de la sensibilité.

Cette technique paraît pourtant devoir être encore étudiée, car elle n'impose pas la conservation d'animaux spécifiquement sensibilisés.

TROISIEME PARTIE

PERSPECTIVES D' Avenir oooooooooooooooooooo

La relative simplicité d'emploi des Mastocytes, leur bonne stabilité cytologique dans les conditions expérimentales décrites, permet d'utiliser ce protocole pour de nombreux travaux ultérieurs.

EN IMMUNOLOGIE:

----- La dégranulation immunologique spécifique des Mastocytes par l'antigène qui a servi à sensibiliser les animaux dont ils sont extraits et la possibilité d'inhiber cette dégranulation en épuisant l'antigène par contact préalable avec un sérum humain contenant des réa-gines allergiques correspondantes doit permettre de dépister des Anticorps circulants dans les allergies les plus fréquentes. L'entretien permanent de quelques rats sensibilisés n'est pas un écueil dans la mesure où ils sont réutilisables après une expérience, et la rapidité du test autorise son emploi en quelques heures, dans des conditions de semi-urgence. Il est toutefois évident qu'on doit, dans cette technique, se limiter aux allergènes les plus courants. Beaucoup plus intéressante apparaîtrait donc la méthode de PERELMUTTER, qui n'emploie que des animaux neufs. Pour notre part, nous n'avons pu encore la renouveler: l'incubation de la suspension de Mastocytes avec un sérum sensibilisé ou allergique, et reconnu tel par d'autres méthodes, ne nous a pas permis d'observer de transfert de sensi-bilisation, ni par séjour au froid (une heure à 4 degrés C), ni par séjour à 37 degrés (une heure), ni a fortiori extemporanément. On se heurte ici au problème général des Anticorps cytophiles (45) : s'ils sont assez aisés à fixer quand il s'agit d'anticorps de lapin, il n'en va pas de même pour les Anticorps humains. Ceci est probablement imputable à une spécificité d'espèce. Il ne fait pas de doute que des recherches doivent être poursuivies dans cette voie, la plus simple, la plus rapide, et uti-lisable dans toutes les allergies, puisqu'il n'est pas besoin d'animaux préalablement sensibilisés.

Il importe aussi de contrôler le type d'Anticorps mis en évidence par cette technique: Ig E, bien sûr, s'il s'agit de réagines allergiques. Dans les autres formes de sensibilisation, on pourra confronter avec d'autres techniques: hémagglutination passive, immunofluorescence, voire dosage radio-immunologique, la nature des Anticorps dépistés (Ig G, Ig M, Ig A) après épuisement des sérums en chaque fraction d'immunoglobuline. On sait en effet qu'un même antigène peut produire différents types d'Anticorps, ce qui explique probablement que des techniques différentes donnent des résultats dissociés. A cet égard, la confrontation des techniques doit permettre une meilleure connaissance fondamentale des Anticorps. Nous avons d'ailleurs entrepris pour cela le dépistage d'Anticorps anti-thyroidiens. Certes le rôle des Anticorps circulants dans les maladies auto-immunes paraît bien moindre que celui de l'Hyper-sensibilité Retardée, mais la Thyroglobuline, qui passe pour un auto-antigène des plus typiques a été trouvée circulante chez des témoins sans Anticorps anti-thyroidien; chez d'autres ont été découverts des Anticorps sans qu'existe pour autant le moindre stigmatisme de thyroidite lymphocytaire.

Le rôle du Complément mérite aussi d'être exploré, par étude comparée d'un même sérum avant et après décomplémentation par chauffage à 56 degrés. La littérature consultée n'est pas claire à ce sujet, et nos résultats n'ont pas été assez constants pour nous permettre cette étude.

EN PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE:

----- Certes, comme le dit LAGUNOFF (27), le rôle des Mastocytes demeure bien obscur; mais leur aptitude à libérer des médiateurs chimiques, comme leur abondance dans le tissu périvasculaire leur attribue une fonction privilégiée dans les phénomènes inflammatoires locaux et le choc, c'est à dire sur la microcirculation (MUSTARD -31-; JANOFF-21-; COPLEY-14-)

Très schématiquement, ces cellules sont dégranulées sous l'action indépendante ou conjuguée d'enzymes libérées par les cellules agressées et par les Granulocytes accumulés par chimiotactisme là où les protéases libérées ont hydrolysé des protéines extra-cellulaires; par un facteur lysosomal granulocytaire; par l'acidose locale qui ne manque pas de s'installer dès que la micro-circulation est entravée.

La libération d'Histamine et de Sérotonine, l'activation parallèle du système des Kinines, en particulier sous l'action du kallikréinogène granulocytaire, la rapide installation d'un thrombus plaquettaire, avec polymérisation de la fibrine concourent encore à perturber la microcirculation et à entretenir ainsi l'acidose locale. On comprend qu'un cercle vicieux puisse très vite s'installer, pérennisant les phénomènes inflammatoires, et conduisant à une nécrose locale ou à la chronicité, si l'activation immédiate de la Plasmine ne rétablit pas rapidement une microcirculation satisfaisante. Il est donc du plus grand intérêt de mieux préciser les inter-relations des différents systèmes activateurs, inhibiteurs et antagonistes actifs à ce niveau:

- ° Rôle de la Kallikréine, des Kinines et des kininases sur les Mastocytes; comme KELLER l'a fait en 1964;
- ° Rôle des Mastocytes dans l'activation du kininogène plasmatique;
- ° Rôle des Mastocytes sur l'aggrégabilité plaquettaire;
- ° Rôle des Mastocytes dans l'activation du plasminogène, qui a été évoqué en 1964 par KWAAN;
- ° Rôle de la polymérisation de la fibrine sur les Mastocytes; les travaux de BAECKELAND (7) constituent déjà une approche du problème;

- ° Rôle des divers facteurs de la coagulation sur les Mastocytes, Facteur Hageman et Facteur XIII en particulier;

- ° Etude de la réactivité mastocytaire aux substances libérées par les Granulocytes soumis à diverses agressions, chimiques, bactériennes et traumatiques.

Ces études doivent aider à comprendre la physiopathologie de la micro-circulation, les facteurs initiaux des réactions en chaîne observées et profiter ainsi à la thérapeutique, en facilitant l'étude de substances capables d'inhiber la dégranulation mastocytaire in vitro. C'est ainsi que le Cromoglycate disodique, dont on a d'abord pensé qu'il bloquait la formation des complexes antigène-Anticorps, agirait par inhibition de la Phospholipase A normalement présente à la surface des Mastocytes, et responsable de la libération d'Histamine (ORR et COX- 32-).

Enfin, comme l'ont fait la plupart des auteurs modernes, nous entreprenons actuellement de comparer les scores de dégranulation avec le dosage fluorométrique de l'Histamine libérée (43)(36). La concordance des résultats chiffrés devrait rendre inutile, à l'avenir, le recours à la fluorométrie qui exige un matériel coûteux, au profit du simple établissement d'un score, du moins pour les dépistages cliniques; la fluorométrie ne restant indispensable que pour la recherche.

--- CONCLUSION .

Connus depuis une centaine d'années, c'est initialement par leur seul aspect morphologique que les Mastocytes ont attiré l'attention:

- répartition ubiquitaire
- abondance des granulations cytoplasmiques
- métachromasie.

La mise en évidence à leur niveau de nombreuses enzymes et de plusieurs médiateurs chimiques, essentiellement Histamine et Sérotonine, ainsi que d'Héparine, a renouvelé leur intérêt. Leur aptitude à libérer ces substances sous diverses agressions leur confère une place importante dans l'étude des phénomènes physiopathologiques tels que les perturbations de la microcirculation et surtout les réactions allergiques et anaphylactiques.

L'expérimentation in vitro nécessite ainsi l'emploi de Mastocytes isolés que l'on extrait habituellement du péritoine de rat, selon de nombreux protocoles décrits par divers auteurs. Tous ont en commun de nécessiter le sacrifice des animaux. Il nous est apparu que la sensibilisation de rats destinés à une seule expérience est une méthode onéreuse, et qui impose une animalerie importante. C'est pourquoi nous décrivons une technique nouvelle d'extraction des Mastocytes péritonéaux, qui conserve vivants et réutilisables les animaux et permet cependant avec régularité et reproductibilité d'obtenir une extraction satisfaisante: dix millilitres environ de suspension à une bonne concentration: environ un million de Mastocytes par millilitre.

Ces cellules ainsi recueillies sont alors soumises à une action dégranulante, étalées sur lames, et le grand nombre de Mastocytes présents sur les préparations permet une interprétation statistique de l'expérimentation.

Toutefois la différenciation entre Mastocytes granuleux et dégranulés laisse place à des aspects intermédiaires pour lesquels nous avons cru devoir introduire, comme on le fait en cytochimie, la notion de Score, ce qui autorise une interprétation chiffrée, donc de plus faciles comparaisons. Les Mastocytes que l'on recueille doivent aussi conserver leur réactivité biologique. Ils ont donc été soumis à diverses agressions physiques: froid, chaleur, hypotonie et hypertonie; et à l'action de libérateurs d'histamine: 48/80 et Polymyxine B. Les résultats obtenus permettent de confirmer le caractère "biologiquement intact" des cellules.

Les Mastocytes d'animaux sensibilisés restent susceptibles de se dégranuler *in vitro*, en présence de l'antigène spécifique, et peuvent dès lors être utilisés pour le dépistage de réagines allergiques dans le sérum de malades par un test d'inhibition de la dégranulation immunologique spécifique, d'intérêt qualitatif et quantitatif. Nos essais, réalisés avec des animaux sensibilisés à la Pénicilline G ont donné des résultats inconstants, essentiellement parce que le seuil de sensibilité des Mastocytes a souvent été très élevé, témoignant d'une sensibilisation insuffisante.

Le champ d'utilisation des Mastocytes obtenus par la technique que nous décrivons n'est pas limité, mais paraît devoir permettre d'aborder de nombreux problèmes de Physiopathologie générale. C'est ainsi que nous entreprenons actuellement le dépistage d'Anticorps anti-thyroidiens, en comparant les scores de dégranulation avec le dosage fluorométrique de l'histamine libérée.



BIBLIOGRAPHIE

Nous ne citons que les publications les plus récentes, et celles qui ont été ici explicitement utilisées. On peut en effet se référer à la Bibliographie exhaustive contenue dans:

- 1 +++ SELYE H. The Mast Cells
 1 Vol. 498 p. Butterworths Ed. Washington 1965
- 2 ADAMS D.D. A theory of the pathogenesis of Rheumatic fever,
 glomerulonephritis and other autoimmune diseases triggered
 by infection.
 Clin. Exp. Immunol. 5 ; 105 ; 1969
- 3 ARCHER G.T. Release of Histamine from rat mast cells by blood treated
 with Dextran.
 Nature (London) 184 ; 1151 ; 1959
- 4 ARCHER G.T. Release of Heparine from the mast cells of the rat.
 Nature (London) 191 ; 90 ; 1961
- 5 ARVY L. Les Labrocytes (Mastzellen)
 Revue Hémat. 10 ; 55 ; 1955
- 6 ASBOE-HANSEN G. et WEGELIUS O. Histamine and mast cells.
 Studies on living connective tissue in the hamster check pouch.
 Acta Physiol. Scand. 37 ; 350 ; 1956
- 7 BAECKELAND E. Effets du sérum frais sur les mastocytes péritonéaux de
 rat en survie in vitro.
 C. R. Soc. Biol. 162 ; 1231 ; 1968
- 8 BOYDEN S.V. Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic
 acid and subsequent agglutination by antiprotein sera.
 J. Exp. Med. 93 ; 107 ; 1951
- 9 BRIGGS N.T. Immunological injury of mast cells in mice actively and
 passively sensitized to antigens from Trichinella spiralis.
 J. of Infect. Dis. 113 ; 22 ; 1963

- 10 BROCKLEHURST W.E. Slow reacting substance and related compounds.
Progr. Allergy 6 ; 539 ; 1962
- 11 CALVETI P.A. Complement fixation studies in allergy.
J. Allergy 21 ; 532 ; 1950
- 12 COOMBS R.R.A., HOWARD A.N. et MYNORS L.S. A serological
procedure theoretically capable of detecting incomplete
or non precipitating antibodies to soluble protein antigens.
Brit. J. Exp. Path. 34 ; 525 ; 1953
- 13 COTTENOT F. Contribution à l'étude de la physiologie normale et
pathologique du Mastocyte et de la substance fondamentale
du tissu conjonctif.
Thèse Paris 1954 n° 823
- 14 COPLEY A.L. Capillary permeability- capillary incontinence compaction
stasis and basement membrane break down.
3 ème. Europ. Conf. Microcirculation
Jérusalem 7 ; 148 ; 1964
- 15 DEGOS R. Les Mastocytoses.
Bull. Soc. Méd. Hop. 72 ; 111 ; 1956
- 16 FEINBERG R.J. et FLICK J.A. Elution of pollen antigens from tannic acid
treated erythrocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N-Y) 96 ; 71 ; 1957
- 17 FLAVIAN N., SAINDELLE A. et PARROT J.L. Dégranulation des
Mastocytes mésentériques et libération d'Histamine chez le
rat par quelques nouveaux histamino-libérateurs.
C. R. Acad. Sciences D-265 ; 553 ; 1967
- 18 HALPERN B. Synthèse cellulaire et structure moléculaire des Immunoglobulines
1 Vol. 367 p. Dunod Ed. Paris 1969

- 19 HALPERN B.N., JACOB M., BINAGHI R. et PARLEBAS J. Mise en évidence et dosage des Anticorps allergiques par l'hémagglutination in vitro dans les syndromes allergiques humains et expérimentaux.
Revue Franç. Allerg. 1; 201 ; 1961
- 20 HILL M. Ueber den einfluss experimenteller schockbedingungen auf die mastzellen.
Acta Anat. (Basel) 35; 118; 1958
- 21 JANOFF A. Effect of an antihistaminic on the increased vascular permeability induced by leucocyte lysosome fractions.
Nature (London) 212; 1605 ; 1966
- 22 JOHNSON A.R. et MORAN N.C. Selective release of Histamine from rat mast cells by compound 48/80 and antigen.
Amer. J. Physiol. 216; 453 ; 1969
- 23 JOHNSON A.R. et MORAN N.C. Comparison of several methods for isolation of rat peritoneal mast cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. , 123 ; 886; 1966.
- 24 KELLER R. Tissue mast cells in immune reactions.
I vol., Karger éd., 1966, Basel (Switzerland) New-York, 144 p.
- 25 KELLER R. et SORKIN E. Adsorption of rabbit antibody by rat tissue mast cells and others cells in vitro.
Nature (London), 199, 709, 1963.
- 26 KY N.Y., HALPERN B., LAGRUE G. et LANGLOIS C. La transformation lymphoblastique in vitro des lymphocytes appliqués à l'étude de l'allergie microbienne.
Presse Méd., 74, 1119 ; 1966.
- 27 LAGUNOFF D. The properties of mast cells proteases .
P.221 in Chemical Biology of inflammation, par HOUCK J.C. et FORSCHER B.K., Pergamon Press éd., Oxford, 1968.
- 28 MAJNO G. et PALADE G.E. Studies on inflammation. The effect of histamin and serotonin on vascular permeability. An electron microscopic study.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 11, 571, 1961.

- 29 MILLER J.J. et COLE L.J. Proliferation of mast cells after antigenic stimulation in adults rats.
Nature (London) ,217,263,1968 .
- 30 MOTA I. et DIAS DA SILVA W. Antigen-induced damage to isolated sensitized mast cells.
Nature (London),186,245,1960.
- 31 MUSTARD J.F.,MOVAT H.Z. et MC MORINE D.R.L. Release of permeability factors from the blood platelets.
Process. Soc. Exp. Biol. Med.,119,988,1965.
- 32 ORR T.S.C. et COX J.S.G. Disodium cromoglycate,an inhibitor of mast cell degranulation and histamin release induced by phospholipase.
Nature (London),223,197,1969.
- 33 PADAWER J. et GORDON A.S. Isolation of mast cells from other cellular elements of rat peritoneal fluid.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.),88,29,1955.
- 34 MORGAN,MORTON et PARKER. Milieu 199,in
PARKER R.C. Methods of tissue culture. 1 vol.,Hoeber ed.,3° édition,1961.
- 35 PORTNOY J. et SHERMANN W.B. Complement fixation studies in ragweed allergy. I.-Quantitative complement fixation studies with ragweed pollen extract and homologous rabbit antisera.
J.Allergy,25,215,1954.
- 36 RENOUX M. et MIKOL C. Intérêt du dosage fluorimétrique de l'histamine libérée par le sang du lapin au cours d'une réaction antigène-anticorps.
Rev. Franç. Allerg. 8 ; 73 ; 1968
- 37 RILEY J.F. et WEST G.B. The presence of Histamine in tissue mast cells.
J. Physiol. (London) 120 ; 528 ; 1953
- 38 ROWLEY D.A. Venous constriction as increased vascular permeability produced by 5 HT, Histamine, Bradykinin.
Brit. J. Exp. Path. 45 ; 56 ; 1964
- 39 SCHAYER R.W. Formation and binding of Histamine by free mast cells of rat peritoneal fluid.
Amer. J. Physiol. 186 ; 199 ; 1956

- 40 SCHWARTZ J., KLOPSTOCK A., ZIKERT-DUVDEVANI P. et HONIG S.
Detection of hypersensitivity by indirect rat mast cells
degranulation.
Inter. Arch. Aller. 26 ; 333 ; 1965
- 41 SEZARY A. A propos de la nosologie de l'Urticaire pigmentaire. Les
Mastocytomes.
Bull. Soc. Franç. Derm. Syph. 43 ; 357 ; 1936
- 42 SHELLEY W.B. et JUHLIN L. A new test for detecting anaphylactic
sensitivity: the Basophil reaction.
Nature (London) 195 ; 1056 ; 1961
- 43 SHORE P.A., BURKHALTER A. et COHN V.H. Jr. A method for the
fluorometric assay of histamine in tissues.
J. Pharmacol. Exp. Therm. 127 ; 182 ; 1959
- 44 SLORACH S.A. et UVNAS B. Dissociation of Histamine release and
 $^{22}\text{Na}^+$ uptake in rat mast cells exposed to compound
48/80 in vitro.
Acta Physiol. Scand. 76 ; 201 ; 1969
- 45 SORKIN E. Cytophilic antibodies. Their detection, nature and
possible biological significance. p. 239-270
in (18) : Synthèse cellulaire et structure moléculaire
des Immunoglobulines.
- 46 UVNAS B. et THON I.L. Isolation of "biologically intact" mast cells.
Exp. Cell. Res. 18 ; 512 ; 1959
- 47 VARDINON N., LEVANON M. et SCHWARTZ J. The immunological
value of the mast cell disruption-inhibition test.
Acta Allerg. 22 ; 28 ; 1967
- 48 VITRY G. et OHRESSER Ph. Utilisation de grains isolés de mastocytes
pour la mise en évidence de phénomènes allergiques.
C. R. Acad. Sc. Paris 263 ; 1921 ; 1966

- 49 WITEBSKY E., KITE J.H. Jr., WICK G. et COLE R.K. Spontaneous thyroiditis in the obese strain of chickens. 1: demonstration of circulating auto antibodies.
J. Immunol. 103 ; 708 ; 1969
- 50 YALOW R.S. et BERSON S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature (London) 184 ; 1648 ; 1959

oooooooooooooooooooo

TABLE DES MATIERES

oooooooooooooooooooo

Avant-propos

Introduction

Pluralité des Anticorps

Mise en évidence

Réactions de Précipitation

Réactions de déviation du Complément

Réactions d'agglutination passive

Réactions cellulaires

Radio-immunologie

Dosage des Anticorps

Première partie: Les Mastocytes 12

Historique 13

Rôle de quelques médiateurs chimiques 14

Histamine

Sérotonine

Kinines

Mastocytes et médiateurs chimiques 17

Expérimentations sur tissus et animaux vivants 19

Isolement de Mastocytes péritonéaux 20

Extraction

Expériences utilisant les Mastocytes isolés

Critique d'ensemble de ces méthodes

Origine des Mastocytes 23

Facteurs de la dégranulation

Deuxième partie: Travaux personnels	28
Mise au point d'une technique originale	
Extraction	
Expérimentations	
Appréciation du degré de dégranulation	
Conditions à respecter	
Contrôle de la réactivité des Mastocytes	34
Orientation générale	
Résultats	
Agents physiques	
Libérateurs d'histamine	
Aggressions immunologiques	39
Préparation des animaux	
Analyse critique des causes d'erreur	
Essai d'application diagnostique	43
Test d'inhibition de la dégranulation spécifique	
Transfert passif de sensibilisation	
 Troisième partie: Perspectives d'avenir	
en Immunologie	48
en Physiopathologie générale	50
 Conclusion	52
Bibliographie	54

Vu, le Président de la Thèse,

R. LAPLANE

Vu, le Doyen Honoraire, Administrateur
provisoire de la Faculté de Médecine,

G. BROUET

Vu, et permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris,

M. MALLET

